

Diagnóstico Molecular de *Pseudomonas aeruginosa*

Gaytán-Alcocer, M. †

Resumen

Las empresas de microarreglos actualmente están desarrollando tecnologías a un menor costo, escáneres y programas más simplificados para el diagnóstico molecular de *Pseudomonas aeruginosa* entre otras. Estas mejoras podrían hacer que la tecnología de microarrays sea atractiva para los laboratorios que carecen de grandes presupuestos necesarios para la obtención de los sofisticados equipos de biochips. Algunos países europeos, como Alemania, han desarrollado una nueva plataforma de microarrays basada en ensayos no fluorescentes que integran ADN, oligo o arrays de proteínas en tubos de reacción tipo eppendorf.

Abstract

Companies in the microarray sector are trying to take the technology out of core facilities by developing technologies such as smaller, less-costly scanners and more streamlined software for array analysis in bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*. These improvements could make microarray technology more attractive to labs that lack the large budgets required for sophisticated biochip-related equipment. Germany, has taken this trend one step further with the launch of its Array Tube, a new nonfluorescence-based microarray platform that integrates DNA, oligo, or protein arrays with standard reaction tubes.

Introducción

Organismo descrito por primera vez en el año 1882, que requiere oxígeno para desarrollarse. Se tratan de bacilos Gram Negativos, agrupados en parejas de cadenas cortas o aisladas, que poseen un flagelo polar, aunque raras veces poseen 2 o 3, son móviles y no esporulados. Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas como *Arabidopsis thaliana* y a invertebrados como *Caenorhabditis elegans*. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón.

P. aeruginosa representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados.

† Docente de la Lic. de Médico- Cirujano, UAEM-Chimalhuacán, Octubre 2015.

Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección de *P. aeruginosa* encontramos toxinas, como las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos.

Asimismo, *P. aeruginosa* presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas.

Sin embargo, a la vez que *P. aeruginosa* causa al hombre distintos problemas, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Por otra parte se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada y produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos o con metales pesados y que produce enzimas, como la lipasa, con distintas aplicaciones potenciales.

P. aeruginosa es una de las bacterias más estudiadas en biología molecular y su genoma ha sido totalmente secuenciado recientemente (www.pseudomonas.com).

Es el único caso conocido de una bacteria ambiental en la que todos sus aislamientos son potencialmente patógenos para el hombre.

Es también una característica particular de esta bacteria la ubicación de los genes que intervienen en la virulencia de la bacteria, ya que no están codificados en las llamadas "islas de patogénesis" como en las demás bacterias patógenas, sino se encuentran interdispersas en su cromosoma.

Estructura del Genoma

Recientemente se completó la secuencia del genoma de la cepa *PAOI*, que es la cepa tipo de *P. aeruginosa* y fue aislada de un paciente con **otitis media**. Esta secuencia ya se encuentra disponible en Internet (www.pseudomonas.com) y su análisis ya está publicado. El tamaño aproximado del único cromosoma circular que forma el genoma de esta bacteria es de cerca de 6.3 millones de pares de bases. Esta cepa, al igual que muchos otros aislamientos de *P. aeruginosa*, no contiene plásmidos. Más de la mitad de los genes de *P. aeruginosa PAOI* presentan una homología cercana y un arreglo transcripcional en operones similar a los de *Escherichia coli*. También es aparente que *P. aeruginosa* presenta homología en la secuencia y en la organización genética con bacterias ambientales, incluso con bacterias gram-positivas. El 32% de los genes predichos a partir de la secuencia del genoma de esta bacteria *no tienen homología* con las secuencias depositadas en los bancos de datos, lo que sugiere que se trata de genes que codifican para actividades enzimáticas novedosas. Del análisis del genoma de esta bacteria es notoria la gran cantidad de genes que parecen codificar para "bombas" que sacan compuestos de la célula. La abundancia de estos transportadores pudiera estar relacionada con su alta resistencia a distintos compuestos tóxicos y, en última instancia, con su gran versatilidad. El proyecto de secuenciación del genoma de la cepa *PAOI* fue realizado por la fundación para la Fibrosis Quística, la Universidad de Washington, y la compañía PathoGenesis. El interés de estas organizaciones es fundamentalmente clínico, ya que su objetivo principal es encontrar nuevos fármacos y otras herramientas para combatir las infecciones por *P. aeruginosa*.

Variabilidad Genética

Contrariamente a lo que ocurre con otras bacterias patógenas, no existen clones de *P. aeruginosa* asociadas con el desarrollo de una enfermedad, por lo que la frecuencia de las distintas clones es la misma entre los aislamientos ambientales y clínicos. Es decir, en una determinada región geográfica se encuentra que la frecuencia con la que se aísla una cepa es la misma si se muestrean hospitales, pacientes con distinto tipo de infecciones o se toman muestras ambientales. Sin embargo existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria aún obtenida en la misma región.

El tamaño del genoma de distintas cepas de *P. aeruginosa* varía entre 5 y 7 millones de pares de bases, y comprende un mosaico de genes específicos de la especie que va del 70 al 90% de la secuencia de DNA de una cepa.

Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad de información accesoria que cada cepa tiene, pero el orden de los genes propios de la especie está conservado entre todos los aislamientos. Estos bloques de DNA se interrumpen por *secuencias específicas* de cada cepa que pueden ser de entre 1 a 200 kb.

La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria, a excepción del gen *pilA* que codifica para la fimbria tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. De hecho, la variabilidad de las secuencias específicas de *P. aeruginosa* es 10 veces menor que la que presentan distintas cepas de *E. coli* o *Salmonella*, lo que sugiere una alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria. La alta frecuencia de recombinación entre las distintas clones, comparada con la relativamente menor tasa de mutación espontánea, mantiene una información genética común a toda la especie. De este modo, *P. aeruginosa* tiene una parte de su genoma altamente conservada y una proporción menor, pero significativa, que es distinta en cada clona de esta bacteria. La alta conservación entre cepas de la mayor parte del genoma de *P. aeruginosa*, aunada a la presencia de genes específicos, podría explicar la capacidad de esta bacteria de colonizar tan diversos nichos y de utilizar como sustrato una gran variedad de compuestos. En un determinado nicho ecológico la población bacteriana puede emplear toda la información genética propia de la especie y, al mismo tiempo, cada clona contiene secuencias propias que son el motivo de una acelerada *evolución genética*.

Plásmidos

Una de las características de las bacterias del género *Pseudomonas* es su gran capacidad para catabolizar distintos *hidrocarburos aromáticos* y *alifáticos*. Esta característica generalmente está codificada en plásmidos, llamados catabólicos que casi siempre se encuentran en cepas de *P. putida* y rara vez en *P. aeruginosa*. En el caso de esta última bacteria su enorme versatilidad metabólica parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican para enzimas con actividades novedosas. Los plásmidos que se presentan en *P. aeruginosa* codifican para resistencias a antibióticos o a metales y su extensa distribución representa un problema clínico. Es interesante mencionar que si bien son frecuentes los plásmidos que confieren resistencia a antibióticos y metales pesados entre los aislamientos de *P. aeruginosa*, no lo son tanto como para considerar que estos elementos genéticos formen parte de su

genoma. Por otro lado, *no existen datos* que sugieran que los plásmidos tengan un papel en la alta tasa de recombinación que presenta esta bacteria.

Virulencia en Plantas e Invertebrados

En un muestreo de cepas de *P. aeruginosa* se determinó que el aislamiento clínico PA14 era capaz de infectar a la planta *Arabidopsis thaliana*, y que utilizaba factores de virulencia comunes para infectar a esta planta y al gusano *Caenorhabditis elegans* causandole una muerte rápida (4 a 24 hrs) en un medio con alta concentración de sal, o una muerte lenta (2 a 3 días) en un medio con baja concentración de sal. Estos resultados muestran que algunas cepas de *P. aeruginosa* tienen la capacidad de infectar huéspedes tan diversos como son plantas, animales invertebrados y mamíferos, y que algunos factores de virulencia participan en todas estas interacciones patogénicas, mientras que otros factores sólo participan en alguna de ellas.

El sistema de secreción tipo III transloca las proteínas directamente de la bacteria a la célula eucarionte, por lo que se encuentran presente en bacterias patógenas de plantas o animales. En *P. aeruginosa* varias exotoxinas se translocan a las células eucariontes mediante este sistema tipo III. Entre estas toxinas se encuentran las exotoxinas **S y T** que bloquean la transducción de señales de la célula infectada mediante su actividad de ADP-ribosil-transferasa, así como la exotoxina **Y** -descrita recientemente-, eleva el *AMP-cíclico*, pues tiene actividad de adenilato ciclasa. Las proteínas que intervienen en el tipo de secreción III tienen homología estructural con proteínas que intervienen en el ensamblaje del flagelo.

"Sistema Sensor de Quorum"

Pseudomonas aeruginosa, al igual que otras bacterias cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten modificar la expresión de distintos genes en respuesta de cambios en el medio ambiente. También es la bacteria en la que se ha encontrado la mayor proporción de genes que codifican para proteínas que son potencialmente reguladores transcripcionales. Uno de estos sistemas regulatorios, que también está presente en muchas otras bacterias, responde no directamente a las condiciones medio ambientales, sino *fundamentalmente a cambios* en una población bacteriana, ya que promueve cambios en la expresión genética en función de la *densidad celular*. Este sistema regulatorio detecta cuándo se ha llegado a una masa crítica de bacterias por lo que se le ha denominado "**sensor de quorum**". El mecanismo mediante el cual se regula la expresión genética en altas densidades celulares se basa en la producción baja y constante por cada célula de un compuesto difusible llamado *autoinductor*. Cuando el número de células llega a cierto umbral en el que la concentración del *autoinductor* es suficientemente elevada, este compuesto interacciona y activa a cierto activador transcripcional que, a su vez, cambia el patrón de expresión génica. En un gran número de bacterias gram-negativas los *autoinductores* son derivados acilados de la lactonas de homoserina. *P. aeruginosa* contiene más de un sistema "**sensor de quorum**", dos de estos sistemas denominados **Las y Rhl**, han sido muy bien caracterizados a nivel molecular. Sin embargo, recientemente se ha reportado mediante el análisis de la

secuencia del genoma de la cepa *PAOI* un tercer regulador transcripcional de la familia de los activadores de la respuesta sensora de quorum llamado **QscR**, que a diferencia de los otros dos sistemas mencionados, tiene un papel negativo en la regulación de la respuesta sensora de quorum.

Microarreglos para el diagnóstico molecular

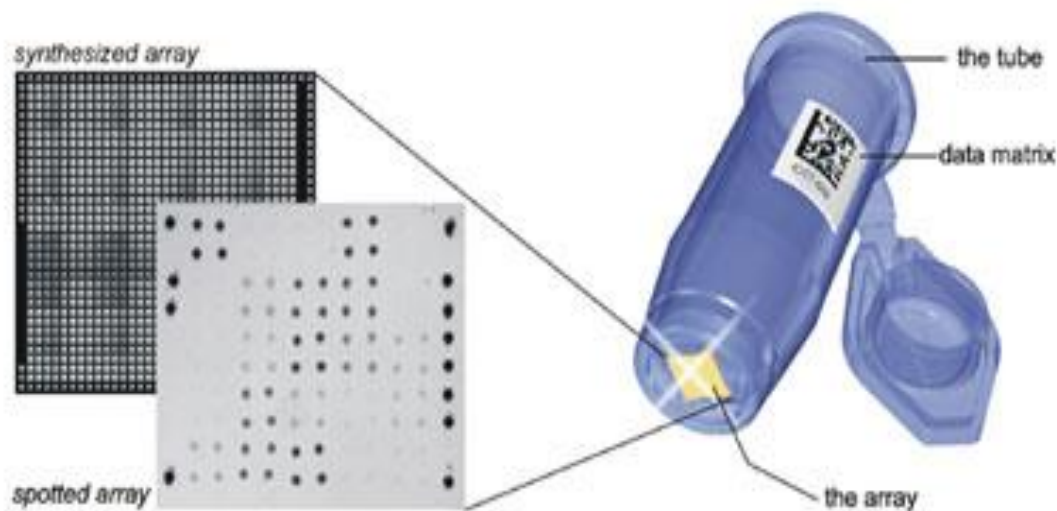
Con 14 *SNPs* (single nucleotide polymorphism) se tipifican las diferentes estirpes de la bacteria, estos marcadores se localizan en 7 loci del genoma bacteriano (*ori C*, *oprL*, *fliC*, *alkB2*, *citS*, *oprI* y *ampC*). La combinación de estos *SNPs* mas el tipo de *fliC* presente (a ó b) han permitido efectuar la dsicriminacion de las distintas cepas de *Pseudomonas*.

Las técnicas empleadas para el análisis de los SNPs fueron la secuenciación de ADN y el análisis de **RFLP** (restriction fragment length polymorphism).

Finalmente, por medio de *Array tubes* (*Ats*) conteniendo 77 oligonucléotidos específicos para la determinacion y patotipo de las estirpes de *P. aeruginosa* se ha logrado llegar a una discriminacion del **99.7 %**.

En la figura adjunta se pueden observar los diferentes tipos de marcadores de la pueba (www.clondiag.com).

Interpretación de microarreglos Ats®



En la primera zona del microarreglo (zona Gris), se agrupan islas de genes involucrados en diferentes rutas metabólicas y genes de resistencia a metales pesados.

En la zona Azul se encuentran genes que se piensa están involucrados en factores de virulencia de *Pseudomonas*, así como genes de receptores de Píoverdina *fpvA* tipo I-III y *fpvB* con alto grado de recombinación.

En la zona central se encuentran diversos tipos de genes:

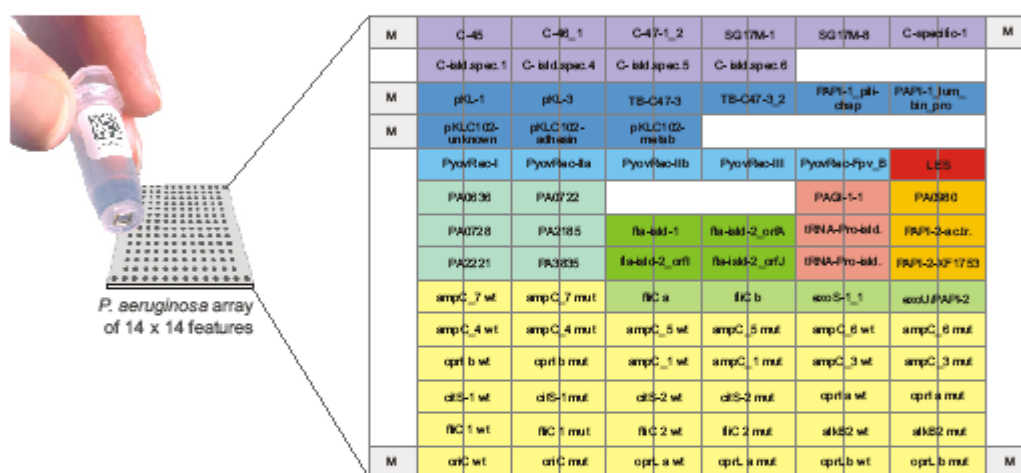
1. Azul claro. Genes variables presentes solo en alguna estirpe.
2. Verde. Genes presentes en cepas de flagelina tipo A incluyendo genes *orfA* a *orfN*.
3. Rojos y Rosas. Genes relacionados con la cepa muy virulenta LES (Liverpool epidemic strain) y también genes muy virulentos presentes en otras estirpes como TB.
4. Color Mostaza. Islas de genes PAPI-2.

En la zona Amarilla y Verde claro. SNPs de regiones del genoma conservados, así como genes que codifican para flagelos tipo a/b responsables de la adherencia a antígenos de superficie. También genes para toxinas (secreciones tipo III), empleados como marcadores genotípicos.

Finalmente, las letras M son los marcadores de Biotina para control y posición de la microplaca.

AT Array *P.aeruginosa*

Main part of the AT application are the ArrayTubes (ATs) containing integrated arrays, which are provided with 77 specific oligonucleotide probes for *Pseudomonas aeruginosa* strain discrimination and pathotyping. The first (lower) part of each array is designed to provide probes representing specific SNPs from conserved gene regions of *P.aeruginosa* allowing strain discrimination up to a specificity of 99,7%. The second (upper) part of the array comprises probes representing sequences of relevant pathogenity markers and gene islands. Each probe of the array is immobilized twice. An additional set of immobilized marker probes allows for internal reaction control.



SNPs:	single nucleotide polymorphisms of conserved genomic regions for genotyping
flc a/b:	flagella type a/b responsible for bacterial adherence to surface antigens
exoS/U:	bacterial toxins, type III-secretion; also used as genotyping marker (in most strains, either exoS or exoU is present)
variable genes:	group of variable genes present only in some strains; cross-reaction free detection
fla.glyc. islands:	genes present in strains of flagellin type A comprising orfA - orfN-genes
other gene islands:	genes present in some highly virulent strains, e.g. LES, TB
PAPI-2:	genes of PAPI-2 islands
LES:	sequence in most strains related to highly virulent LES (Liverpool epidemic strain) done
Pyoverdine Rec.:	genes of Pyoverdine receptors fpvA type I-III and fpvB; genes of high recombination rate
pKLC102/PAPI-1:	mobile genetic elements (integrated in tRNA-Lys) believed to be involved in spread and exchange of virulence factors of <i>P.aeruginosa</i> populations
PAGI-2/PAGI-3:	gene islands distantly related to pKLC102/PAPI-1 group (integrated in tRNA-Gly), but with different cargo genes; involved in different metabolic pathways and in heavy metal resistance
M biotin marker:	marker spots for control of colorimetric staining reaction and for grid alignment recognition

Bibliografía

1. Bergen, G. A., & J. H. Shelhamer. 1996 Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10: 297-325.
2. Cervantes, C & S. Silver. 1996. Metal resistances in *Pseudomonas*: Genes and mechanisms. In: *Molecular biology of Pseudomonas*. T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas and S. Silver (eds.) ASM Washington DC, pp 398-416.
3. Chugani, S. A., M. Whitley, K. M. Lee, D. D'Argenio, C. Manoil, and P. Greenberg. 2001. QscR, a modulator of quorum sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98:2752-2757.
4. Costerton, J. W. 1980 *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabbath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
5. Döring, G., Maier, M., Müller, E., Zoubair, B., Tümmeler, B. & Kharazmi, A. 1987. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother.* 39: 136-148.
6. Frantz, B. & A. M. Chakrabarty. 1986. Degradative plasmids in *Pseudomonas*, p 295-325. In: I. C. Gunsalus, J. R. Sokatch (ed.), *The Bacteria*, vol. X. Academic Press, Inc. Orlando, Fla.
7. Fuqua, W. C. & E. P. Greenberg. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 183-189.
8. Fuqua, W. C., S. C. Winans, & E. P. Greenberg 1996 Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* 50: 727-751.
9. Gracia Morales, Lutz Wiehlmann, Peter Gudowius, Christian van Delden, Burkhard Tümmeler, José Luis Martínez, and Fernando Rojo Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Populations Analyzed by Single Nucleotide Polymorphism and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Genotyping *Journal of Bacteriology*, July 2004, p. 4228-4237, Vol. 186, No. 13.
10. Hacker, J., G. Blum Oehler, I. Mueldorfer & H. Tschaep. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23: 1089-1097.
11. Hardalo, C. & S. C. Edberg 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.
12. Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker 1997 *Brock Biology of Microorganisms*, Eighth edition. Prentice Hall. New Jersey. pp.698-701.
13. Maier, M. R., and G. Soberón-Chávez. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:625-633.
14. Miller, R. M., 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl): 59-62.

15. Mohr, C. D., L. Rust, A. M. Albus, B. H. Iglewski, & V. Deretic. 1990. Expression patterns of genes encoding elastase and controlling mucoidy: coordinate regulation of two virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 4: 2103-2110.
16. Nikaido, H., H. Okusu, D. Ma, & X.-Z. Li 1996. Multidrug efflux pumps make a major contribution to drug resistance in *Pseudomonas*. In: *Molecular biology of Pseudomonas*. T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas and S. Silver (eds.) ASM Washington DC, pp 353-362.
17. Römling, U., Wingender, J., Müller, H. and Tümmler, B. 1994 A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol.* 60: 1734-1738.
18. Salmond, G. P. C., B. W. Bycroft, G. S. A. B. Stewart, & P. Williams 1995 The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Mol Microbiol.* 16: 615-624.
19. Schaeffer T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S. & Fall, R. R. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 742-746.
20. Silver, S. and T. K. Misra. 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 717-743.
21. Soberón-Chávez G. & B Palmeros. 1994 *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol.* 20: 95-105.
22. Stover, C. K., S. Lory & M. V. Olson. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* genome and functional genomic approaches to identifying new drug targets. Abstract S32. In: Abstract book of the symposium *Pseudomonas '99: Biotechnology and Pathogenesis*, Maui, Hawaii. ASM Press, Washington D. C.
23. Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Miizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, f. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman,, Y. Yuan, I. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, & M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
24. Tan M.-W. & F. M. Ausubel. 2000. *Caenorabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 29-34.
25. Zgurskaya, H. I. & H. Nikaido. 1999. Biochemistry of AcrAB/MexAB multidrug/solvent efflux pumps. Abstract S46. In: Abstract book of the symposium *Pseudomonas '99: Biotechnology and Pathogenesis*, Maui, Hawaii. ASM Press, Washington D.C.